

TRYPTOPHAN OPERON, PEPTIDE AND PROTEIN CODED THEREBY, UTILIZATION OF TRYPTOPHAN OPERON GENE EXPRESSION AND PRODUCTION OF TRYPTOPHAN

[71] Applicant: AJINOMOTO CO INC

**[72] Inventors: MATSUI KAZUHIKO;
SANO TAKANOSUKE;
MIWA KIYOSHI;
OTSUBO EIICHI**

[21] Application No.: JP61087600

[22] Filed: 19860416

[43] Published: 19871024

[illegible]

Go to Fulltext

[57] Abstract:

PURPOSE: To efficiently produce the titled tryptophan in a large amount, by cultivating a microorganism transformed by a DNA sequence capable of coding an enzymic group of a tryptophan synthetic system, etc., in a culture medium.

CONSTITUTION: A chromosomal gene obtained by extracting microbial cells of *Brevibacterium lactofermentum*, etc., of the genus *Brevibacterium* is cleaved with a restriction enzyme to give a DNA, consisting of DNA expressed by the formula containing an operator region controlling the synthesis of m-RNA, promoter region controlling the synthesis of m-RAN, etc. The resultant DNA is then subjected to ligation reaction with a plasmid vector to afford a recombinant DNA, which is further introduced into a variant strain requiring tryptophan to carry out transformation and provide coryneform bacteria having the ability to produce tryptophan. The resultant bacteria are then aerobically cultivated in a culture medium containing a carbon source, nitrogen source, etc., to produce and accumulate the aimed tryptophan in the culture medium. COPYRIGHT: (C)1987,JPO&Japio

[51] Int'l Class: C12N01500 C07H02104 C07K01300 C12P01322
C12P02102 C12P01322 C12R00113 C12P01322 C12R00115

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-244382

⑮ Int. Cl. *

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)10月24日

C 12 N 15/00

7115-4B

C 07 H 21/04

7138-4C

C 07 K 13/00

8318-4H

C 12 P 13/22

A-7236-4B ※審査請求 未請求 発明の数 8 (全20頁)

⑭ 発明の名称 トリプトファンオペロン、トリプトファンオペロンにコードされる
ペプチド及び蛋白、トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用方法
及びトリプトファンの製造法

⑯ 特 願 昭61-87600

⑰ 出 願 昭61(1986)4月16日

特許法第30条第1項適用 昭和60年11月15日 日本分子生物学会発行の「第8回日本分子生物学会年
会プログラム・講演要旨集」により発表

⑱ 発 明 者 松 井 和 彦 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑲ 発 明 者 佐 野 孝 之 輔 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑳ 発 明 者 三 輪 清 志 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
㉑ 発 明 者 大 坪 栄 一 東京都文京区西片1-13-6
㉒ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

トリプトファンオペロン、トリプトファン
オペロンにコードされるペプチド及び蛋白、
トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用
方法及びトリプトファンの製造法

2. 特許請求の範囲

1) m-RNA の合成をコントロールするオペレー
ター領域、m-RNA の合成をコントロールするプロ
モーター領域、m-RNA の合成をコントロールする
アテニュエーター領域、蛋白合成に必要なリボゾ
ームとm-RNA との結合領域、リーダーペプチドを
コードする領域、トリプトファン合成系の酵素群
をコードする領域及び最後にm-RNA の合成を停止
させるシグナルを形成するターミネーター領域が
含まれる下記第一式に示される配列よりなるDNA

CCGGTTGTC GGCATTGCTG TCCCTGAGGT GCGTAAATCC CAAGAATTGT GGGATATGGC GCACCGTGTG CTTGGCCCGT TGTGGGTGCT GTGGGGAGTT
 GGGCCAACAC CCGTAAGCAC AGGGACTCCA CGCATTTAGG GTTCTTAACA CCTATATCCG CGTGGCACAG GCACCGGGCA ACACCCACGA CAGCCCTCAA
 TCCTTTGTTA TTGCTCGCT ACTTCCGTTT GTGGCCTTCT GGTTCGATGT GGCTGGTCTG GGCATTGGCT GTTGTGCTG CCATCGTCTT CATTCGCATG
 AGGAAACAAT AACGGAGCGA TCAACGCAAA CACCGGAAGA CCAACCTACA CCGACCAGCA CCGTAACCCA CAACAGCGAC GGTAGCACAA GTAACCGTAC
 GGTGCGGGTA TGGCTCGCGA TACTGTTGCG ATGTTTGATG CGAACGCGAT CGCGAAACCC CGCAGGCGCC TGTTCGCTT GAAATTGAAG AGGAGGCGCG
 CCACGCCCCAT ACCGACGCGT ATGACAACCG TACCAACTAC GCTTGGCTCA GCGCTTTGGG GCGTCCGCGG ACAGAGGCGA CTTAACTTC TCCTCGGGCC
 TGGTGTGACT ATTACCTCGC CGATTATCAA CAGACTCCG CTGAATGCCC CCAAGATTGA CTTGGATGCA GTGCGTAGAG CTGGCGAAAC TACACAAGAA
 ACCACACTGA TAATGGAGCG GCTAATAGTT GTTCTGAGCG GACTTACGGG GGTTCCTAAT GAACCTACGT CACGCATCTC GACGCTTTG ATGTGTTCTT
 CCAAAAAATG ATTAATAATT GAGACAAGCT TCCCACTATG TGATAAAGTC CCATTTTGTG AATAACTCTT GTCTCAGTCA AAGCACCCAG TGGTGGTGGC
 GGGTTTTTAC TAATTATTAA CTCTGTTCCA AGGGTGATAC ACTATTTACG GGTAAACAC TTATTGAGAA CAGAGTCAGT TTCGTGGGTC ACCACCACCG
 GCGCTAACTA AGCGAGCGCT ACACCTCAAG TTGTTTTAC TTTGATGAAT TTTTAAAGGC TCGTACTTCC TTGACGAAG AAGCGGGCCT TTTGTGGTTT
 CCGGATTGAT TCGCTCGGAC TGTGGAGTTC AACAAAAGTG AACTACTTA AAAAAATTCG AGCATGAAGC AAGCTGCTTC TTCGCGCGGA AACACCAAA
 TTAGCCCAAC ACCGGCAAGC CCTGGATCGA ATGAAGCTCG CAGCGAGTAA TTATTTGATG TTTCCAGAA AGGCTTCAGC CCCACAATGA TTTCTCGGT
 AATCGGGTGT TGGCGGTTCC GGACCTAGCT TACTTCGAGC GTGCTCATT AATAAATAC AAAGGGTCTT TCGAAGTCC GGTGTTACT AAAGGAGCCA
 AGGTGCCCCA TGAGCAGGAA TCCCATGTT TTTCCCTAG ATGTCCGCTA TCAGGAGGAT GCTTCTGCGT TGTTCGCGCA CTTGGGTGGC ACAACCGCAG
 TCCACGGGGT ACTGCTGCTT AGGGGTACAA AAGAGGGATC TACAGGCGAT AGTGCTCCTA CGAAGACGCA ACAACGGGT GAACCCACCG TGTGGCGCTC
 ATGATGCAGC CTTGTTGGAA AGCGCTGATA TCACCACCAA GAATGGTATT TCTTCCCTCG CGGTGTTGAA GAGTTCGGTG CGCATTACGT GCACGGGCAA
 TACTACGTCC GGACAACCTT TCGCGACTAT AGTGGTGGTT CTTACCATAA AGRAGGGAGC GCCACAACCT CTCAAGCCAC GCGTAATGCA CGRFCCGCTT

 CACGGTGGTA ACCGAGCGCG TGACCGACTC GGGTAGGGCA GTGGTTGGCG GCCTAACACA GCAGCTTGGC CAGTACAACA CCGCAGAGAA CACCTTTAGC
 GTGCCACCAT TCGCTCGGCG ACTGCTGAG CCCATCCCGT CACCAACCGG CGGATTGTGT CGTGGAACCG GTCATGTTGT GCGGTCTCTT GTGGAATCC
 TTCCCGCCCT CCGATCGGGT TGATGAGCGC GAGCGCTCA CCGCACCAAG CACCATCGAA GTGCTGGCA AGTTGCAGTT CGAGTCCGGC TACAGCGAGC
 AAGGGCGGGA GCGTACGCA ACTACTCGCG CTCGGGAGT GCGCTGCTTC GTGGTAGCTT CACGACGCGT TCAACCTCAA GCTCAGGCGG ATGTGGCTCC
 CGTCCCTGCC ACTGCTCATG GCGGGTTTCC CTTTGATTT CTTAGAAACC TTTGAAACCG TCCCGCAGT CGAGGAAAGC GTCAACACTT ACCCCGATTA
 GCAGGGACCG TGACGAGTAC CCGCCAAAGC GGAACCTAAA GAATCTTTGG AACTTTGCG AGGGCGGTCA GCTCCTTTCC CAGTTGTGAA TGGGGCTAAT
 CCAGTTCGTC CTCGCGGAAA TCGTCTGGA CATCAATCAC CAGGACCAGA CCGCCAAACT CACCGGCGTC TCCAACGCCC CAGCGGAGCT CGAGGCGGAG
 GGTCAAGCAG GAGCGCCTT AGCAGGACCT GTAGTTAGTG GTCTGCTCT GCGGGTTTGA GTGGCGGAG AGGTTGCGGG GTCCGCTCGA GCTCCGGCTC
 CTCAACAAGC TTTGATTGCT TATCGAGCGC GCGCTCCCG CAACCGAACA CGCTACCAA ACCACCCCTC ACCAGGGCGA CACTCTTCCG GTTGTGGCTG
 GAGTTGTTCC AAGTAACGA ATAGCTCGCG CCGGAGGGCG GTTGGCTTGT CCGGATGCTT TGGTGGGGAG TGCTGCGGCT GTGAGAGCGC CAACACCGAC
 ATATTCCCGA TGCTCAGTTC CGCACTCAGA TCAATGAGCT GAAAGAAAAC ATTTACAACG GTGACATCTA CCAAGTTGTC CCGGGCGGCA CTTTCACCGC
 ATATTGGGCT ACGAGTCAAG GCGTGAGTCT AGTTACTCGA CTTTCTTTTG TAAATGTTGC CACTGTAGAT GGTTCACAG GCGCGCCCGT GAAAGTGGCG
 ACCATGTCTT GATGCATTCC CTGCTTATCT GCAGCTGCGT GCCACCAACC CGTCGCGGTA CATGTTCTAT ATCCGTGGAC TCAACGAAGG TCGCTCGTAT
 TGGTACAGGA CTACGTAAGC GACGAATAGA CGTCGACCGA CCGTGGTTGG GCAGCGGCAT GTACAAGATA TAGGCACCTG AGTTGCTTCC AGCGAGGATA
 GAACTTTTTG GCGCATCCCC TGAGTCCAAC CTCAAGTTCA CCGCTGCTAA CCGTGAGCTG CAGCTGTACC CAATCGCAGG TACCGCCCCC CGTGGACTCA
 CTTGAAAAAC CCGGTAGGGG ACTCAGGTTG GAGTTCAAGT GCGGACGATT GGCACCTGAC GTGACATGG GTTAGCGTCC ATGGGCGGGG GCACCTGAGT
 ACCCAGATGG CTCCATCAAC GATGAGCTAG ATATCCGCAA TGACTTGGAT ATGGGCACTG ATGCCAAGA GATCGCGGAC GACACCATGC TTGTGATCT
 TGGGTCTACC GAGGTAGTTG CTACTCGATC TATAGGCGTT ACTCAACCTA TACGCGTGAC TACGGTTTCT CTAGCCCTG CTGTGCTAGC AACAGCTAGA
 CCGCCGCAAC GACCTCGCCC CCGTCTCGGT CCCAGCGTCC CCGCGGGTTG CGGATCTTTT GCAGGTGGAT CGCTATTCCC CCGTGATGCA CTTGGTCTCC
 CCGGGCGTTG CTGGAGCGGG CGCAGAGCCA GGGTCCGAGC CCGCCCCAAC GCCTAGAAAA CGTCCACCTA GCGATAAGGG CGCACTACCT GAACACAGG

特開昭 62-244382 (3)

CGTGTGACGG CGACGTTGGA CCCAGAGCTT GATGCTTTGG ACGCCTATCG GCGGTGCATG AATATGGGCA CGTTGACCGG CGCTCCGAAG TTGCGCGCTA
GCACACTGCC GCTGCAACCT GGGTCTCGAA CTACGAACCC TCGGATAGC CCGCAGGTAC TTATACCCGT GCAACTGGCC CGGAGGCTTC AACCGCGCAT

TGGAGCTGTT GCGCGGCGTC GAAAAGCGCA GCGGTGGTTC TTATGGTGGG GCAGTGGGGT ACCTGCGCGG CAATGGCGAT ATGGATAATT GCATTGTTAT
ACCTCGACAA CCGCGCGCAG CTTTTGCGGT CCGCAGCAAG AATACCACCC CGTCACCCCA TGGACGCGCC GTTACCGCTA TACCTATTAA CGTAACAATA

TGCTTGGGGG TTTGTCCAGG ATGGTGTGGC TGCTGTGCAG GCTGGTGGTC GTGTGGTCCG CGATTCTAAT CCTCAATCTG AAGCCGATGA GACGTTGCAC
AGCAAGCCCG AACACAGGTC TACCACACCG ACGACAGGTC CGACCACGAC CACACCAGGC GCTAAGATTA GGAGTTAGAC TTGGGCTACT CTGCAACGTC

AAGGCGTATG CCGTGTGAA TGCCATTGCG CTTGCTGGTC GTTCCACTTT GGAGGTCATC CGATCAGACA CGTTGTTCTC ATTGATAATC AGGATTCTTT
TTCCGCATAC GGCACAACCT ACGGTAAGCG GAACGAGGAC CAAGGTGAAA CCTCCAGTAG CTTACTGTGT GCAACAAGAG TAACCTATTAG TGCTAAGAAA

TGCTACAAAC CTGGTGGATG CGTTGCGCGT GCGCGGTTAT AAGTGACCGG TGTTCGCGAA TACGGTGCCA GTTCAAAACCA TTTTGGCAGC CAACCCCGAC
ACAGATGTTG GACCACCTAC GCAAGCGGCA CCGGCCAATA TTCAGGTGCC ACAAGGCGTT ATGCCACGCT CAACTTTGGT AAAACCGTCG GTTGGGCGTC

CTCATCTGCC TTTACCTGG ACCTGGTTAC CCTGCGGATG CCGGCAACAT GATGGCGCTG ATCGAGCGCA CACTCGGCCA GATTCCCTTA CTGGGTATTT
GACTAGACGG AAAGTGGACC TGGACCAATG GGACGGCTAC GCGCGTTGTA CTACCGCGAC TAGCTCGCGT GTGAGCGCGT CTAGGGAAT GACCCATAAA

GCCTCGGCTA CCAGGCACTC ATCGAATACC ACGGCGGCAA GGTGAGCCT TGTGGCCCTG TGCACGGCAC CACCGACAAC ATGATCCCTA CTGATGCAGG
CGGAGCGGAT GGTCCGTGAG TAGCTTATGG TCGCGCGGTT CCAACTCGGA ACACCGGGAC AGGTGCGCTC GTGGCTGTTG TACTAGGAAT GACTACGTCC

TGTGCAGAGC CTTGTTTTG CAGGCTCTGC CACTGATGTT GAGGCTGATC ATCCAGAAGT CCCAGGCGCG AAGGTTCCAA TTGGCCGTTA TCACTCACTG
ACAGCTCTCG GGACAAAAAC GTCCAGAAGC GTGACTACAA CTCGGACTAG TAGGTCTTCA GGGTCCGGCG TTCCAAGGTT AACCGGCAAT AGTGAGTGAC

GCCTGCGTGG TTGCCCCAGA CCGTATTGAA TCATTGGGCA CCTGTTCTCT TGAGATTGGT GATGTATCA TGGCGGCAGG CACCACCGAT GGAAAGGCCA
CCGACGCACC AACGGGGTCT GCCATAACTT AGTAACCGGT GGACAAGGAG ACTCTAACCA CTACAGTAGT ACCGCGGTGC GTGGTGGCTA CTTTCCGGT

TTGGCCTGCA GTTTCACCT GAGTCAGTC TGAGCCCAAC GGGTCTATC ATTTGTCCC GCTGTGTGCA ACAACTTCTC CCGAACTAAT AAAAAGGATT
AACCGGACGT CAAAGTGGGA CTCAGTCAGC ACTCGGGTTC CCGAGGATAG TAAACAGCG CGACACAGCT TGTGAAGAG CGTTGATTA TTTTCTCTAA

TGATTGATGA CTTCTCCAGC AACACTGAAA GTTCTCAACG CCTACTTGGA TAACCCCACT CCAACCCCTG AGGAGGCAAT TGAGGTGTTT ACCCCGCTGA
ACTAAGTACT GAAGAGGTG TGTGACTTT CAAGAGTTGC GGATGAACCT ATTGGGGTGA CTTGGGGACC TCCTCCGTTA ACTCCACAAG TGGGGCGACT

CCGTGGGTGA ATACGATGAC GTGCACATCG CAGCGCTGCT TCGGACCATC CGTACTCGCC GTGAGCAGTT CGCTGATATT GCGCGCGCTC CCAAGGCATT
GGCAECCACT TATGCTACTG CAGCTGTAGC GTGCGGACGA ACCCTGGTAG GCATGAGCGC CACTCGTCAA GCGACTATAA CCGCGCGGAC GGTTCGTA

CCTCGCGCGG GCTGCTCCGT TCCCGATTAC TCGCGCAGGT TTGCTAGATT CCGCTGGCAC TGGTGGCGAC GGTGCCAACA CCATCAACAT CACCACCGGC
GGAGCGCGCG CGAGCAGGCA AGGGCTAATC ACCGCGTCCA AACGATCTAA GCGGACCGTG ACCACCGCTG CCACGGTTGT GGTAGTTGTA GTGGTGGCG

GCTTCCCTGA TCGCAGCATC CCGTGGAGTC AAGCTGGCTA AGCACGGCAA CCGTTCAGTG AGCTCCAAGT CCGGTTCCGC CGATGTGCTG GAGGCGCTGA
CGAAGGGACT AGCGTCTAG GCCACCTCAC TTGACCGAT TCGTGCCGTT GGCAAGTCAC TCGAGGTTCA GGCCAAGGCG GCTACCGAC ATCGCGGACT

ATATTCCCTT GGGCCTTGAT GTGGATCGTG CTGTGAAGTG GTTGAAGCG TCCAACCTCA CTTCTCTGTT CACACCTGCG TACAACCTG CGATTGCGCA
TATAAGGAAA CCGGGAACCT CACCTAGCAC GACACTTCAC CAAGCTTCGC AGGTTGAAGT GGAAGGACAA GTGTGGACGC ATGTTGGGAC GCTAAGCGCT

TGTGCAGCGG GTTGGCCAGG CGGTGAAATT CCCCACCATC TTCAACACGC TTGGACCATT GCTGTCCCGG CCGCGCCCGG AGCGTCAGAT CATGGGCGTG
ACAGCTCGGC CAAGCGGTCC GCGACTTTAA GGGGTGGTAG AAGTTGTGG AACCTGGTAA CGACAGGGGC CCGCGCGGCG TCGAGTCTA GTACCCCGAC

GCCAATGCCA ATCATGGACA GCTCATCGCC GAGGTCTTCC GCGAGCTGGG CCGTACACGC GCGCTTGTTC TGCATGGCGG AGGCACCGAT GAGATCGCAG
CGGTTACGCT TAGTACCTGT CGAGTAGCGG CTCCAGAAGG CGCTCGACCC GGCATGTGCG CGCGAACAAC ACGTACCGCG TCGTGGCTA CTCTAGCGTC

TCCACGGCAC CACCTTGGTG TGGGAGCTTA AAGAAGACGG CACCATCGAG CATTACACCA TCGAGCCTGA GGACCTTGGC CTTGGCGCGT ACACCTTGA
AGGTGCGGTG GTGGAACCA ACCCTCGAAT TTCTTCTGCC GTGGTAGCTC GTAATGTGGT AGCTCGACT CCTGGAACCG GAACCGGCGA TGTGGAACT

GGATCTCGTG GGTGGCCTCG GCACTGAGAA CCGCGAAGCT ATGCGCGCTA CTTTCCCGGG CACCGCCCTT GATGCACACC GTGATCGGTT GGCTGCGTCC
CCTAGAGCAC CCACCGGAGC CGTGACTCTT GCGGCTTCCA TACGCGCGAT GAAAGCGGCC GTGGCGGGA CTACGTGTGG CACTACGCAA CCGACGAGG

GCAGGTGCGA TGTCTATCT CAACCGCGAT GTGACTCCT TGAAGCATCG TGCACAAAAG GCGCTTTCCT TGCTTGGCGA CCGGACCAAC CAGGCA7GGT
CGTCCACGCT ACAAGATAGA GTTGGCGCTA CAGCTGAGGA ACTTCTTACC ACGTGTTTTC CCGGAAGGGA ACCAAGCGCT CCGCTCGTGG GTCCGTACCA

特開昭62-244382 (4)

TGGCCAAGCA CGAAGAGATC GATTACTCAG AAAAGGAGTC TTCCAATGAC TAGTAATAAT CTGCCCACGG TGTGGGAAAG CATCGTGGAG GGTGGTGGG
 ACCGGTTGGT GCTTCTCTAG CTAATGAGTC TTTTCTCAG AAGGTTACTG ATCATTATTA GACGGGTGGC ACAACCTTTC GTAGCACCTC CCAGCAGGGC

 GACACCTGGA GGAATTTGGC GCTCGCATCG CTCACGTGGA TGTGGATGGC CTTCACAAAT CCACCCGCTC TGTGTTGGAT TCCCTCAACC AGGGTAGGGG
 CTGTGGACCT CTTTAAGCG CGACCGTAGC GAGTGCACCT ACACCTACGC GAAGGTTTTA GGTGGGGGAG AGACAAGCTA AGGGAGTTGG TCCCATCCCC

 AGGGGGGGGT TTCTATCATG AGTGCAAGTC CGCATCGGCT TCTTTGGGAA TGATTCTGTA GCACTACCAG CCGGGTGAAA TCGCTCGGCT GTACTCTGGC
 TCCCCGGGCA AAGTAGTACC TCACGTTTCA GCGTAGCGGA AGAAACCCCT ACTAAGCACT CGTGATGGTC GGGCCACTTT AGCGAGCGCA CATGAGAGCG

 TACGCAGGGC CAATTTCCGT GCTGTGGGAG CCGGATCGTT TTGGTGGGCA TTACGATCAC CTCGCTACCG TTGGCGCTAC CTCTCATCTT CCGGTGCTGT
 ATCGGTGGCC GTTAAAGGCA CGACACGCTC GCGCTAGCAA AACCAACGCT AATGCTAGTC GAGCGATGGC AACCGCGATC GAGAGTAGAA GCGCACGACA

 GCAAGAGCTT CATCATTTGAT CCTGTCCAGG TACGACCGGC GCGTTACTTT GGTGCTGATG CCATCCTGCT CATGCTCTCT GTGCTTGATG ATGAAGAGTA
 CGTTTCTGAA GTAGTAAGTA GGACAGGTCC ATGCTGGCGG CGCAATGAAA CCACGACTAC GGTAGGACGA GTACGAGAGA CACGAACCTAC TACTTCTCAT

 CGACGCACTC GCTGGCGAGG CTGCGCGTTT TGATCTGGAT ATCCTCAGCG AGGTTATTGA TGAGGAGGAA GTGCGCGCGC CCATCAAGCT GGTGCGAAG
 GCTGGGTGAG CGACGGCTCC GACGCGGAAA ACTAGACCTA TAGGAGTGGC TCCAATAACT ACTCCTCCTT CAGCGGGGCG GGTAGTTGGA CCCACGCTTC

 ATCTTTGGCG TCAACCAACG CAACCTGCAT GATCTGTCCA TTGATTGGGA TCGTTACGCT CCGCTGTCCA AGCTCATTCG AGCAGATGCC GTGCTCGTGT
 TAGAAACCGC AGTTGCTGGC GTTGGACGTA CTAGACAGGT AACTAAACCT AGCAAGTGGA GCGGACAGGT TCGAGTAAGG TCGTCTACGG CACGAGCACA

 CTGAGTCTGG CGTGGCGGAT ACCGAAACCG TCGGCCAGCT AGGTGGGCAC TCGAATGCAT TCCTCGTTGG CTCCAGCTC ACCAGGACAG AAAACGTGGA
 GACTCAGACC GCACGGGCTA TGGCTTTGGC AGGGGTCGA TCCACCGCTG AGGTTACGTA AGGACCAACC GAGGGTCGAC TGGTGGGTCC TTTGACAGCT

 TCTGGCAGCC CGGGAATTGG TCTACGGCCC CAACAAAGTC TCGGAGCTCA CCTCACCAGG TGCAGCACAA ACCGCTCGCG CAGCGGGTGC GGTCTACGGC
 AGACCTCGG CGGCTTAACC AGATGCGGGG GTTGTTTTCA AGGCTGAGT GGAGTGGTTC AGTCTGTCTT TGGCGAGCGC GTGCGCCAGC CCAGATCGCG

 GGGCTCATCT TCGAAGAGGC ATCGCCACGT AATGTTTCA GGTAAACATC CCAAAAAATC ATCGCCGAG AGCCCAACCT GCGCTACGTC GCGGTACGCC
 CCGAGTAGA AGCTTCTCGG TAGCGGTGCA TTACAAAGTC CACTTTGTAG CGTTTTTTAG TAGCGGCGTC TCGGGTTGGA CCGGATGCAG GCGCAGTCGG

GTGGCACCTC CCGGTACAAG GATTTGCTTG TCGACGGCAT CTTCGGCGTA CAAATCCAGC CCCCACCTGA GGGCAGCGTC GAAGCAGAAA AGGCATTGAT
 CAGGCTGGAG GCGCATGTT CTAACGAAAC AGCTGCGGTA GAAGCGGCAT GTTTAGGTGC GGGGTGACGT CCGGTGCGAG CTTCGTCTTT TCCGTAACTA

 CCGCGCGGTT CGTGAAGAGG TTGGACGGCA GGTCCAGGTC TGGCGCGGGA TCTCGATGTC CAGCCCGCTG GGGGCTGAAG TGGCAGAGGG TGACGTGAT
 GCGCGCGCAA GCATTTCTCC AACCTGGCGT CCAGGTCCAG ACCGCGCGCT AGAGCTACAG GTCGGGGAAAC CCGCGACTTC ACCGTCTCCC ACTGCAGCTA

 AAGCTAATTC TTGATGCCCA TGAAGGTGGC AGCGGGGAAG TATTGCACTG GGCTACGGTC CCGCGCGCTG TGAAGGCAAA GTCTTTGCTC GCGGGAGGCA
 TTGATTAAG AACTACGGCT ACTTCCACCG TCGCCGCTTC ATAAGCTGAC CCGATGCCAC GCGCGCGGAC ACTTCCGTTT CAGAAACGAG CCGCCTCCGT

 TCTCTCCGGA CAACGCTGCG CAGGCACTCG CTGTGGGCTG CGCAGGTTTA GACATCAACT CTGGCGTGGA ATACCCCGCC GGTGCAGGCA CGTGGGCTG
 AGAGAGGCTT GTTGGACCGC GTGCTGAGC GACACCGGAC GCGTCCAAAT CTGTACTTGA GACCGCACTT TATGGGCGCG CCAGCTCCGT GCACCCCGAC

 GGGCGAAAGA TCGCGGCGCG CTGCTGAAAA TTTTGGCGAC CATCTCCACA TTCCATTACT AAAGGTTTAA ATAGGATCAT GACTGAAAAA GAAACTTTGG
 CCGCTTTCT ACCGCGCGCG GACGACTTTT AAAAGCGCTG GTAGAGGTGT AAGGTAATGA TTTCCAAATT TATCCTAGTA CTGACTTTTT CTTTTGAACC

 GCGGCTCCAC GCTGCTACCT GCATACTTCC GTGAATTCCG CGGCCAGTTC GTGGCGGAAT CCCTCCTGCC TGCTCTCGAC CAGCTGGAGA AGGCCTTCGT
 CCGCCAGCTG CGACGATGGA CGTATGAAGC CACTTAAGCC GCGGTCAGG CAGCGCCTTA GGGAGGACCG ACCAGAGCTG GTCGACCTCT TCCGGAAGCA

 TGACGGCACC AACAGCCAG AGTTCCGCGA AGAACTCGGC GGCTACCTCC GCGATTATCT CCGCGCGCCA ACCCGCTGA CCGAATGCTC CAACCTGCCA
 ACTGCGCTGG TTGTGGGTC TCAAGGCGCT TCTTACCCCG CCGATGAGG CGCTAATAGA CCGCGCGGCT TGGGCGGACT GGCTTACGAG GTTGCAGGGT

 CTGGCAGGCG AAGGCAAGG CTTTGGCGCG ATCTTCTCA AGCGCGAAGA CCTGCTCCAC GCGGCTGCAC ACAAACTAA CCAGGTGATC GCGCAGGTGC
 GAGGCTCCCG TTCCGTTTTCC GAAACGCGCC TAGAAGGAGT TCGCGCTTCT GGAGCAGGTG CCGCCACGTC TGTTTTGATT GGTCCACTAG CCGGTCCAGC

 TGCTTGCCAA GCGCATGGG AAAACCGGCA TCATCGCAGA GACCGCGGCA GCGCAGCAGC GCACCGCCAC CGCTCTCGCA TGTGGGCTCA TGGGCTCGA
 ACGAACGGTT CCGGTACCG TTTTGGGCGT AGTAGGCTCT CTGGCGCGCT CCGGTCTGTC CGTGGCGGTG GCGAGAGCGT ACACGCGAGT ACCCGAGGCT

 GTGGGTGTC TACATGGGCG CCAAGGACGT TCGCCGCGAG CAGCCCAAGC TCTACCGCAT GCAGCTGCAC GCGCGGAAGG TCATCCCGCT GCAATCTGGT
 CACGCAACAG ATGTACCGCG GGTTCCTGCA AGCGGCGGTC GTGGGCTTC AGATGGGCTA CGTGCAGCTG CCGCGCTTC AGTAGGGGCA CCTTAGACCA

特開昭62-244382(5)

TCCGGCACCC TGAAGGACCC CGTGAAATGAA CCGCTGCGCG ATTGGACCGC AACCTTCCAC GAGTCCCACT ACCTTCTCGG CACCCGCGCC GCGCGCGACC
 AGGCGGTGGG ACTTCTCGCG CCACTTACTT CCGGACGCGC TAACCTGGCG TTGGAAGCTG CTCAGGGTGA TGGAAAGACC GTGGCGCGCG CCGGGCGTGG
 CATTCCTAAC CATCGTGGGT GAATTCACAC AGGTGATCTC TGAGGAAGCC AAGGCACAGA TGCTAGAGCG CACCGGCAAG CTTCGGACG TTGTGGTGGC
 GTAAGGGTTC GTAGCAGCGA CTTAAGGTGT TCCACTAGAG ACTCCTTCGG TTCCGTGTCT ACGATCTCGC GTGGCGGTTC GAAGGGCTGC AACACGAGCG
 CTGTGTGGGT GGTGGCTCCA ACGCCATCGG CATGTTCGCA GACTTCATTG ACGATGAAGG CGTAGAGCTC GTGGCGGTTC AGCCAGCGCG TGAGGGCTC
 GACACAGCCA CCAACGAGGT TCGGGTAGCG GTACAGCGGT CTGAAGTAAC TGCTACTTCC GCATCTCGAG CAGCCGCGAC TCGGTGGCGC ACTTCCGGAG
 GACTCGGGCA AGCAGGGCGC AACCATCACC AACGGTCAGA TCGGCATCCT GCACGGCACC CGTTCTTACC TGATCGGCAA CTCCGACGGC CAAGTGGAG
 CTGAGGGCGT TCGTGGCGCG TTGGTAGTGG TTGGCAGTCT AGCCGTAGGA CGTGGCGTGG GCAAGGATGG ACTACGGGT GAGGGTGGCG GTTCACCTTC
 AGTCTACTC CATCTCGCGC GGACTTGATT ACCCAGGGGT CCGCCACAGC ACGCACACCT GCACGGCACC GCGCGCACT ACCTTGGTAT CACCGACCGC
 TCAGGATGAG GTAGAGGGCG CCTGAAGTAA TGGGTCCGCA GCGGTGTCTG TCGGTGTGGA CGTGGCGTGG CCGCGCGTGA TGAACCATTA GTGGCTGGCG
 GAAGCCCTCC AAGCATTCCA GTAGCCTCGC CCGCTACGAA GGCATCATCC CCGGCACTGG AATCCTCACA CCGGTTCGGC TACGACTCAA GCGCGCCAAG
 CTTCGGGAGG TTCTTAAGGT CATCGGAGCG GCGGATGCTT CCGTAGTAGG GCGCGTGACC TTAGGAGTGT GCGCAAGCGG ATGCTGAGTT CCGCGCGTCC
 ACCCGCGAAG AGGAAGGGCA GAACCTAACCT ATCCTCGTCT CCCTATCCGG CCGTGGCGAC AAGGACGTTG ACCATCGCGC GCGCACCTTC GAAGAAATC
 TGGCGGCTTC TCCTTCCGGT CTTCGAATTGG TAGGAGCAGC GCGATAGCGC GCGACCGCTC TTCTTCAAAC TCGTAGCGCG GCGGTGGGAG CTCTTTTAC
 CAGAACTGAT CCTGAAGGAC AACCGATGAG CCGTTACGAC GATCTTTTTC GCGACCGCTC GACACGGTCA GGGGAGGGCG CTTTGTTCCT CTTCATCATG
 GTCTTGACTA GGACTTCCTG TTGGCTACTC GGCAATGCTG CTAGAAAAAC CCGTGGGAG CTGTGCCAGT CCGCTCCCGC GGAAACAAGG GAAGTAGTAC
 CTGACCGACC CTTCACCAGA GGAGGCTTTC CAGATCATCT CCACAGCAAT CGAAGCTGGC GCAGATGCAC TCGAACTTGG CGTACCTTTC TCCGACCCAG
 GACTCGCTGG GAAGTGGTCT CCTCCGAAAG GTCTAGTAGA GGTGTGCTTA GCTTGCACCG CGTCTACCTG ACCTTGAACC GCATGGAAAG AGGCTGGGTC
 TTGGCGATGG CCGCACCCTC GCGGAATCCG ACCTCCGCGC ACTCGACGGC GCGGCCACCG TAGACAGCGC ACTCGAGCAG ATCAAGCGCG TCGCGCGAGC
 AACGGCTACC GCGGTGGCAG CCGCTTAGGG TGGAGGGCGG TGAGCTCGCG CCGCGGTGGC ATCTGTGGCG TGAGCTCGTC TAGTTCCCGC ACGCGCGTCC

 CTACCCAGAG GTTCCCATCG GAATGCTCAT CTACGGCAAC GTTCCTTTCA CCGGTGGCTT GGATCGCTTC TACCAAGAGT TCGGTGAAGC TGGCGCAGAC
 GATGGGTCTC CAAGGGTAGC CTACAGGTA GATGCGGTTC CAAGGAAGT GGGCACCGAA CCTAGCGAAG ATGGTTCTCA AGCGACTTCC ACCCGCTCTC
 TCCATCCTCC TCCAGACGT CCCAGTCCCG GAAGGGCGAC CGTTTTCTGC AGCAGCCGGA GTTCATCCCA TTTACATCGC TCGGGCCAAC GCGAGCGAGA
 AGGTAGGAGG ACGGTCTGCA GGGTCAGGCG CTTCGGGTG GCAAAAGACG TCGTGGGCT TAACATAGGT AAATGTAGCG AGGCGGGTTC CCGTGGCTCT
 AAACCTCGA GGGTGTCTCC GCGGCATCAA AGGGCTACAT CTACGGCATC TCCCGCGACG GCGTCACCGC CACCGAACGT GAATCATCCA CCGACGGCCT
 TTTGGGAGCT CCCACAGAGG CCGCGTAGTT TCCCGATGTA GATGCGGTAG AGGGCGCTGC GCGAGTGGCG GTGGCTTGCA CTAGTGGGT GCGTGGCGGA
 GTCCGCACTG GTGGACAACA TCAAGAAATT TGATGGCGCA CCCATCCTCT TGGGCTTCGG CGTCTCATCC CCTCAGCAGC TGGCAGACCG GATTGCAGCG
 CAGGGCTCAC CACCTGTTGT AGTTCTTTAA ACTACCGCGT GGGTAGGAGA ACCCGAAGCC CTGCAGTAGG GGAGTCTGCG ACCGTCTGCG CTACGTTGCG
 GGTGCTTCCG GTGGGATCAC GGGTTCCGCG ATCACCAGA TCATTCCTTC CCACTGGGAA GGTGAGCACC CGAACCCCTC CACCATTCGA CATATGGAGC
 CCACGAAGGC CACGCTAGTG CCCAAGGGCG TAGTGGTTCT AGTAACGAAG GGTGACGCTT CCACTCGTGG GCTTGGGCGG GTGGTAAGCT CTATACCTGC
 GTTGAAGAA GGATCTCACT GAGTTTATCT CTGCGACTGA AGGCAGCGAC CAAGAAGGTT TAGGCTTTTA AATGTGGCAA TGTTTCACCT GAAACATTCT
 CAAACTTCTT CCTAGAGTGA CTCAAGTAGA GACGCTGACT TCCGTGCTG GTTCTTCCAA ATCCGGAAAT TTACACCGTT ACAAGTGCAT CTTTGTAGA
 GAGAGAAATGT AGAAGATCA AAGAAGCCAC CTCTAGCTC TCGGGCTGGG AGGCGGCTTC TTTGTTTGGG GTTTAGGAAA TCTCAGGGTT TTGGAGATCT
 CTCTCTTACA TCTTTCTAGT TTCTTGGGTG GAGGATCGAG AGCCCGACCC TCGGCGAAG AAACAAGCGC CAAATCGTTT AGAGTCCCAA AACCTCTAGA
 TAGCTTGGAG CCGGTGGGGT AGGAGCGGCC GCGGAGGAG CAATCTTAGG GTAGGTCCGA GCGCCAGCGG TTGGAGTGGC ATCAGCTTCC GCGTTCCGCA
 ATCCAAGCTC GCGCACCCCA TCTTGGGGG CCGGCTCTCT GTTAGAATCC CATCCAGGCT CCGGGTGGCG AACCTCACCG TAGTGCAAGG CCGAAGAGGT
 CCGCGCTACC GTTGGGAGCT GGAATCC
 GCGCGGATGC CAACCTCGA CCTAGG

2) 特許請求の範囲第1項記載の各種領域よりなる群から選ばれる1以上よりなるDNA。

3) DNAが人工的に合成されたDNA又は微生物に由来するDNAである特許請求の範囲第1項又は第2項記載のDNA。

4) 微生物がコリネ型細菌である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

5) 微生物がプレバクテリウム属に属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

6) 微生物がプレバクテリウム・ラクトフェルメンタムに属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

7) DNAが1部置換、変異又は削除されたDNAである特許請求の範囲第1項ないし第6項記載のDNA。

8) DNAがプラスミド又はファージ由来のベクターに組込まれたDNAである特許請求の範囲第1項ないし第7項記載のDNA。

9) 特許請求の範囲第2およびまたは8項記載のDNAを用いるL-トリプトファンの製造法。

10) 下記第2式ないし第7式のアミノ酸配列をもつペプチド又は蛋白(第2式ないし第7式中

A アラニン、C システイン、D アスパラギン酸、E グルタミン酸、F フェニルアラニン、G グリシン、H ヒスチジン、I イソロイシン、K リジン、L ロイシン、M メチオニン、N アスパラギン、P プロリン、Q グルタミン、R アルギニン、S セリン、T スレオニン、V バリン、W トリアプトファン、Y チロシンを示す。

なお、第2式はトリプトファンE酵素、第3式はトリプトファンG酵素、第4式はトリプトファンD酵素、第5式はトリプトファンC酵素、第6式はトリプトファンB酵素、第7式はトリプトファンA酵素のアミノ酸配列を示す。)

第 2 式

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MSTNPPIVFSL DVRYHEDASA LFAHLGGTTA DDAALLESAD ITTKNGISSL AVLKSSVRIT CTGNTVVTQP LTDSGRAVVA RLTOQLGOYN TAENTFSFPA									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
SDAVDERERL TAPSTIEVLR KLFESGYSD ASLPLLHGCF AFDLETPTET LPAVEESVNT YPDYQFVLAE IYLDINHDDQ TAKLTGVSNA PGELEAELNK									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
LSLLIDAALP ATEHAYQTTP HDGDTLRVVA DIPDAQFRTQ INELKENIYN GDIYQVVPAR TFTAPCPDAF AAYLQLRATN PSPYMFYIRG LNEGRSYELF									
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
GASIESNLKF TAANRELQLY PIACRPRCL NPDGSINDEL DIRNELDMRT DAKELADDTM LVDLARNDLA RVSVPASRRV ADLLOVDVYS RVMHLVSRVT									
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
ATLOPELDAL DAYRACHNMG TLTCAPKLRA HELLRGVEKR RRGSYGGAVG YLRGNGDMW CIVIRSAFVD DGVAAVQAGA GVVROSNPOS EADETLHKAY									
510	520								
AVLNAIALAA CSTLEVIR									

第 3 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 MTHVVLIDNH DSFVYNLVDA FAVAGYKCTV FRNTVPVETI LAANPOLICL SPGPGYPADA GNMHALIERT LGQIPLLGIC LGYQALIEYH GCKVEPCGPV
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 HGTDMHILT DAGVQSPVFA GLATDVEPDH PEVPGRXVPI GRYHSLGCVV APDGIESLGT CSSEIGDVIH AARTDCKAI GLQFHPESVL SPTGPIILSR
 210
 CVEOLLAN*

第 4 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 MTSPATLKVL NAYLDNPTPT LEBATEVFTP LTVGEYDDVH IAALLATIRT RGEQFADIAG AAKAFLLAAR PFPITGAGLL DSAGTGGDGA NTINITTGAS
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 LIAASGGVKL AKHGNSVSS KSGSADVLEA LNIPLGLDVO RAVKWFEASH FTPLFTPAYH PAIAHVQVVR QALKPPTIFN TLGPLLSPAR PERQINGVAN
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 ANHGQLIAEV FRELCRTRAL VVHCAGTDEI AVHGTTLVWE LKEDCTIEDY TIEPEDLGLC RYTLEDLVGG LGTENAEAMR ATFACTGPDA HRDALAASAG
 310 320 330 340 350
 AMFYLNQDVD SLKDGAQKAL SLLADATTOA WLAKHEEIDY SEKESSND*

第 5 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 MTSNHLPTVL ESIVEGRRCH LEEIRARIAH VDVDALPKST RSLFDSLNGG RGCARFIMEC KSASPSLGHI RENYQPGELA RVYSRYAAAI SVLCEPDRFG
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 GDYDHLATVG ATSHLPVLCK DFIIDPVQVR PARYFGADAI LLMLSVLODE EYDALAAEAA RFDLDILTEV IDEEEVARAI KLGAKIFGVN HRNLHDSID
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 LORSRRLSKL IPADAVLVSE SGVROTETVR QLCGUSNAFL VGSQLTSGEN VOLAARELVY GPNKVCGLTS PSAAQTARAA GAVYGG LIFE EASPRNVSRG
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 TSQXIIAAEP NLBYVAVSRH TSGYKOLLVD GJFAVQIHAP LQGSVEAEMA LIAAVREEVG PQVQVHRAIS HSSPLGAEVA EGDVOKLILD AHEGGSGEVF
 410 420 430 440 450 460 470 480
 DWATVPAAVK AKSLLAGGIS PDNAAQALAV GCAGLDINSO VEYPAGACTW GWGERCRRAA ENFRDULRIP LLKV *

第 6 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MTEKENLGGS TLLPAYFGEF GGFVAESLL PALDOLKAF VDATNSPEFR EELGGYLRDY LGRPTPLTEC SNLPLAGEGX GFARIFLKRE DLVHGGAHKT

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
NOVICGVLLA KRMGKTRIIA ETCAGQHGTA TALACALMGL ECVVYMGAKD VARGQPNVYR HOLHGAKVIP VESGSGTLKD AVHEALRDMT ATFHESHYLL

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GTRAGPIPPF TIVREFHKKVI SEEAKAQMLE RTGKLPDVVV ACVCGGSNAI GHFADFIDDE GVELVGAEPG GEGDSGKNG ATITNGQIGI LGCTRSYLMR

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
NSDGOVEESY SISAGLDYPC VGHSTHTCTP PARTTLVSPT PKPSKHSSSL ARYECIIPRT GILTRVRLRL KRAKTAEEEG QNLITLVSLG GRGDKVDVHR

410     420
AGTLEEKPEL ILKDNR

```

第 7 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MSRYDDLFGD ASTRSGEGAF VPFIMLSDPG PEEAFQIIST AIERGADALE LGVPPSDPVA DGPTVAESHL RALDGGATVD SALEQIKRVR AAYPEVPICH

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
LIYGNVPFTR GLDRFYDEFA EACADSILLP DVPVREGAPP SAAAGIDPIY IAPANASEKT LEGVSAASKG YIYALSRGV TGTERESSTD GLSAVVDNIK

210     220     230     240     250     260     270     280     290
KFDGAPILLG FGISSPDHVA DAIAAGASGA ITGSAITKII ASHCEGHPN PSTIRDMDGL XKDLTEFISA TEGSDQEGLG L

```

11) アミノ酸配列が1部置換、変異、又は削除されたアミノ酸配列である特許請求の範囲第10項記載のペプチド又は蛋白。

12) 特許請求の範囲第10項ないし第11項記載のペプチド又は蛋白をコードするDNA。

13) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のプロモーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

14) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のオペレーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

15) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のアテニューエーターおよび、またはリーダーペプチド領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

16) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のターミネーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、組換えDNA法によるシートリプトフ

ァンの生産菌の分子育種や生理活性ペプチドの生産に応用可能なコリネ型細菌の、さらに限定すればブレビバクテリウムの、トリプトファンオペロンを含むDNA配列とそこにコードされるアミノ酸配列に関する。

本発明にいうコリネ型細菌 (Coryneform bacteria) は、バージース・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー (Bergeys Manual of Determinative Bacteriology) 第8版 599頁 (1974) に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、胞子形成能を有しない桿菌である。このようなコリネ型細菌のうち特に以下に述べるようなコリネ型グルタミン酸生産性細菌が本発明においては、最も好ましいものである。

コリネ型グルタミン酸生産性細菌の野性株の例としては次のようなものがあげられる。

ブレビバクテリウム・ディバリカタム

ATCC 14020

ブレビバクテリウム・サラカロリティウム

ATCC 14066

ブレビバクテリウム・インマリオフィウム

ATCC 14068

ブレビバクテリウム・ラクトフェルメントム

ATCC 13869

ブレビバクテリウム・ロゼウム ATCC 13825

ブレビバクテリウム・フラバム ATCC 13826

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス

ATCC 19240

コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム

ATCC 13870

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

ATCC 15806

コリネバクテリウム・カルナエ ATCC 15991

コリネバクテリウム・グルタミカム

ATCC 13032, 13060

コリネバクテリウム・リリウム ATCC 15990

コリネバクテリウム・メラセコーラ

ATCC 17965

し(例えばH. Saito and K. Miura Biochem. Biophys. Acta 72, 619(1963)の方法が使用できる。)、これを適当な制限酵素で切断する。ついで微生物細胞内で複製し得て、かつプロモーター活性をもつベクターに接続し、得られた組換えDNAを用いて、コリネ型細菌もしくはその他の微生物で、トリプトファン生合成系の構造遺伝子に変異を受け、酵素が活性を失ない、そのためにトリプトファン要求性を示すようになっている変異株を形質転換し、該酵素活性が回復、上昇し、トリプトファン要求性が消失する菌株を採取し、これより該構造遺伝子をもつ複合プラスミドを分離できる。

このような方法でも、幸運にしてオペロン全域を単離できる場合もあるが、もしもオペロン全域を単離(クローン化)できなかった場合は、上述の方法により分離した各構造遺伝子の一部もしくは全部をアイソトープ等でラベルしそれらをプローブにして、プラスミドもしくはファージベクターを用いて作成したコリネ型細菌の染色体遺伝子のジーンバンクからコロニーハイブリダイゼイシ

ミクロバクテリウム・アンモニアフィルム

ATCC 15354

本発明のコリネ型グルタミン酸生産性細菌には上記のようなグルタミン酸生産性を有する野性株のほかにグルタミン酸生産性を有するまたはグルタミン酸生産性を失った変異株も含まれる。

ここでいうトリプトファンオペロンとは、プロモーター、およびアテニューエーター、さらにリーダーペプチドをコードする領域(trpL)、アンスラニル酸シンターゼ遺伝子(trpE, trpG)、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子(trpD)、N-(5'-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子(trpC)、トリプトファンシンターゼ遺伝子(trpB, trpA)の各構造遺伝子が隣接して配置され、一つの転写単位として機能しているものをいう。

各構造遺伝子を単離する方法は、コリネ型細菌のトリプトファンオペロン、或いは、各構造遺伝子を有している株より、まず染色体遺伝子を抽出

ョンにより、単離可能である。

染色体遺伝子を切断するには、切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、市販の制限酵素が使用できる。

本発明のうちトリプトファンオペロンもしくはその1部をトリプトファンの生産に使用する場合に用いるベクターは、コリネ型細菌細胞内もしくはE. coli、B. subtilisにおいて増殖し得るものであればどのようなものでも良い。具体的に例示すれば、以下のものがあげられる。

- (1) pAM 330 特開昭58-67699参照
- (2) pAM 1519 特開昭58-77895参照
- (3) pAJ 655 特開昭58-192900 参照
- (4) pAJ 611 同 上
- (5) pAJ 1844 同 上
- (6) pCG 1 特開昭57-134500 参照
- (7) pCG 2 特開昭58-35197参照
- (8) pCG 4 特開昭57-183799 参照
- (9) pCG 11 同 上
- (10) pCC 1 特開 (Mautin/Ajico)

- (11) pBL 100 特開 ()
 (12) pBR 322
 (13) pC 194

ベクターDNAの開裂は、当該DNAを一箇所で切断する制限酵素を用いて切断するか、複数部位を切断する制限酵素を用いて部分的に切断することにより行う。

ベクターDNAは、染色体遺伝子を切断した際に用いられた制限酵素により切断され、または染色体DNA切断フラグメント及び切断されたベクターDNAのそれぞれの両端に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを接続せしめて、ついでプラスミドベクターと染色体DNAフラグメントとのライゲーション反応に付される。

このようにして得られた、染色体DNAとベクターとの組換えDNAをコリネ型細菌に属する受容菌へ導入するには、エシェリヒア・コリK-12について報告されている様な(Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)) 受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方

グリコールまたはポリビニルアルコールと二価金属イオンとの存在下にDNAをとり込ませる方法も当然利用できる。ポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールの代りに、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、フィコール、ブルロニックF68 (セルバ社) などの添加によってDNAのとり込みを促進させる方法でも同等の結果が得られる。

クローニングしたトリプトファンオペロン、或いは各構造遺伝子を用いてトリプトファン生産菌の分子育種を行うには、遺伝子のクローニングの際に用いたトリプトファン要求性の変異株を宿主として形質転換した株を用いることができるが、以下に示すような宿主を用いればよりトリプトファンの生産性が高い菌株が得られることがある。

ブレビバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファンに耐性を有する変異株 (I. Shio, H. Sato, M. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 36, 2315 (1972))、ブレビバクテリウム属のフェニルアラニンを要求し、m-フ

法、またはバチルス・ズブチリスについて報告されている様に (Duncan, C. H., Wilson, G. A. and Young, F. E., Gene, 1, 153 (1977)) 細胞がDNAを取り込み得る様になる増殖段階 (いわゆるコンピテントセル) に導入する方法により可能である。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類および酵母について知られている様に (Chang, S. and Choen, S. N., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Dibb, M. J., Ward, J. M. and Hopwood, O. A., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J. B. and Frink, G. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978))、DNA受容菌を、プラスミドDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストにして組換えDNA受容菌に導入することも可能である。

プロトプラスト法では上記のバチルス・ズブチリスにおいて使用されている方法でも充分高い頻度を得るとができるし、特開昭57-183799に記載されたコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属のプロトプラストにポリエチレン

ルオロフェニルアラニン、5-フルオロトリプトファンに耐性を有する変異株 (I. Shio, S. Sugimoto, M. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 39, 627 (1975))、ブレビバクテリウム属のチロシンを要求し、5-フルオロトリプトファン、アザセリンに耐性を有する変異株、コリネバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファン、4-メチルトリプトファン、6-フルオロトリプトファン、トリプトファンヒドロキサメート、p-フルオロフェニルアラニン、チロシンヒドロキサメート、フェニルアラニンヒドロキサメートに耐性を有する変異株 (H. Hagino, K. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 39, 345 (1975)) 等がある。

このようにして得られたトリプトファン生産能を有するコリネ型細菌を培養してトリプトファンを生成蓄積せしめる方法は、従来コリネ型細菌によるトリプトファンの製造のために使用されていた方法と特に大きく違う点はない。即ち、培地としては、炭素源、窒素源、無機イオン、更に必要

に応じアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常のものである。炭素源としては、グルコース、シュクロース、ラクトース等及びこれらを含む澱粉加水分解液、ホエイ、糖蜜等が用いられる。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩その他が使用できる。

培養は好氣的条件下で培地のpH及び温度を適宜調節しつつ、実質的にトリプトファンの生産量が停止するまで行なわれる。

トリプトファン生産菌の分子育種に加え、さらに、本発明によって得られるもう一つの大きな利点は、ブレビバクテリウムのトリプトファンオペロンのプロモーターがE.coliのトリプトファンオペロンのプロモーターと同等或いはそれ以上の強い活性を有し、かつその末尾の構造から予測される様に強いターミネーターを有しており、またコリネホルム型細菌内においてトリプトファンにより発現調節を受けるオペレーターを有していることである。E.coliでの異種遺伝子例えば、インク

ーフェロン、成長ホルモン、インターロイキン、神経成長因子、或いはその他生理活性ポリペプチド又は酵素等の発現又は異種蛋白の過剰生産においては、E.coliトリプトファンプロモーター、オペレーター、及びターミネーターが繁用されている。即ち、本発明によって得られたトリプトファンオペロンは、コリネホルム型細菌におけるトリプトファン生産菌の分子育種を勿論促進するが、さらにE.coli系、或いは他のコリネホルム型細菌における遺伝子の強力な発現、及びその調節を行い得るプロモーター、オペレーター、及び、ターミネーターを有するものであり、このDNA配列を用いて上記の異種遺伝子を強力に発現し、過剰生産することが可能である。

また、本発明のDNA配列のうち、遺伝子の発現に關与する部分であるプロモーター領域、オペレーター領域、アテニューエーター領域ならびにリボソーム結合領域の塩基配列、及びターミネーター領域の塩基配列を各々単独で、或いはいずれかを組合わせた形で（取り出して）使用する場合、あ

るいは、各酵素の構造遺伝子の塩基配列について、コードされたアミノ酸配列が異ならないように置換して得たDNA配列も、更にいえば、本発明のDNA配列の任意の部分の塩基を他のものと置換したり、新たに塩基を挿入したり、又は削除した場合、或いは、塩基配列の一部を転位させた場合に得られる誘導体およびそれにコードされるアミノ酸配列の蛋白も、いずれも遺伝子の発現及びトリプトファン生産菌の分子育種に良好な結果を与えるものと想定され、主要部分を本発明に依存する技術として本発明の範囲に入るものである。

以下、具体例によって本発明のDNA配列を含むブレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの取得方法、及び本発明のDNAの塩基配列の決定とアミノ酸配列の決定、並びに本発明のDNAを用いて形質転換して得られるコリネ型細菌によるトリプトファンの生産およびプロモーター、オペレーターについて説明する。

実施例 1.

アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子のクローニング

1-1 ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンを含む染色体DNAの調製

ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム AJ11225 (PERM-P4370) を 1 ℓ の CMG 培地（ペプトン 1 g / ℓ、酵母エキス 1 g / ℓ、グルコース 0.5 g / ℓ、及び NaCl 0.5 g / ℓ を含み、pH 7.2 に調整したもの）に植菌し、30℃で約3時間振盪培養を行ない、対数増殖期の菌体を集めた。

この菌体をリゾチーム・SDS で溶菌させたのち、通常のフェノール処理法により、染色体DNAを抽出精製し、最終的に 3.5 μg の DNA を得た。

1-2 ベクターDNAの調製

ベクターとして pAJ1844（分子重 5.4 メガダルトン）を用い、そのDNAを次の様にして調製した。

まずpAJ1844をプラスミドとして保有するブレ
ビバクテリウム・ラクトフェルメンタムAJ12037
を100 mlのCMG培地に接種し、30℃で対数
増殖期後期まで培養したのち、リゾチームSDS処
理により溶菌させ、30,000×g、30分の超遠心
により上清を得た。フェノール処理ののち、2容
のエタノールを加えてDNAを沈澱回収した。これ
を少量のTEM緩衝液(20 mMトリス塩酸塩、20
mM NaCl、1 mM EDTA (pH 8.0))に溶解後、塩
化セシウム-エチジウムブロミド密度勾配平衡遠
心によりプラスミド画分を分離し、最終的に
pAJ1844 プラスミドDNA 約200 μgを得た。

1-3 染色体DNA断片のベクターへの挿入

1-1で得た染色体DNA 10 μgと1-2で得たプ
ラスミドDNA 5 μgとを制限エンドヌクレアーゼ
Pst Iでそれぞれを37℃に1時間保持し、切断
した。65℃に10分間加熱した後、両反応液を
混合し、ATP及びジチオスレイトール存在下、
T₄ フェージ由来のDNAリガーゼによって10℃
に24時間保持しDNA鎖を連結せしめた。ついで

を集め、菌体を0.5 Mシュウクロース、20 mMマ
レイン酸、20 mM塩化マグネシウム、3.5%ベナ
ッセイブロス(Difco)からなるSMMP培地(pH 6.5)
0.5 mlで洗浄した。次いで10 mg/mlのリゾチ
ームを含むSMMP培地に懸濁し30℃で20時間ブ
ロトプラスト化を図った。6000×g、10分間遠
心分離後、プロトプラストをSMMPで洗浄し0.5
mlのSMMPに再度懸濁した。この様にして得られ
たプロトプラストと1-3で調製したDNA 10 μg
を5 mM EDTA存在下で混合し、ポリエチレングリ
コールを最終濃度が30%になる様に添加した後、
DNAをプロトプラストに取り込ませるために室温
に2分間放置した。このプロトプラストをSMMP培
地1 mlで洗浄後、SMMP培地1 mlに再懸濁し、
形質発現のため、30℃で2時間培養した。この
培養液をpH 7.0のプロトプラスト再生培地上に塗
布した。プロトプラスト再生培地は蒸留水1 mlあ
たりトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン
12 g、KCl 0.5 g、グルコース10 g、
MgCl₂·6H₂O 8.1 g、CaCl₂·2H₂O 2.2 g、

反応液を、65℃にて5分間加熱し、反応液に2
倍容のエタノールを加えて連結されたDNAの沈澱
を採取した。

1-4 アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリ ボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺 伝子、及びトリプトファンシンターゼβサブ ユニット遺伝子のクローニング

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムのア
ンスラニル酸シンターゼ欠損株AS60、ホスホリボ
シルアンスラニル酸トランスフェラーゼ欠損株№
38、トリプトファンシンターゼβサブユニット欠
損株№30(いずれもAJ12125を親株とし、N-メ
チル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジンによ
り変異処理することにより分離した)をDNA受容
菌として用いた。

形質転換の方法としては、プロトプラストトラ
ンスフォーメーション法を用いた。まず、菌株を
5 mlのCMG液体培地で対数増殖期の初期まで培
養し、ペニシリンGを0.6ユニット/ml添加後、
さらに1.5時間振盪培養し、遠心分離により菌体

ペプトン4 g、粉末酵母エキス4 g、カザミノ酸
(Difco社) 1 g、Na₂HPO₄ 0.2 g、コハク酸ナトリ
ウム13.5 g、寒天8 g及びクロラムフェニコー
ル3 μg/mlを含む。

30℃で2週間培養後、各受容菌について各々
約25000個のクロラムフェニコール耐性コロニー
が出現してきたのでこれを最少培地(2%グルコ
ース、1%硫酸アンモニウム、0.3%尿素、0.1
%りん酸二水素カリウム、0.04%硫酸マグネシ
ウム7水塩、2 ppm鉄イオン、2 ppmマンガンイ
オン、200 μg/mlサイアミン塩酸塩、50 μg/ml
ビオチン、カザミノ酸(Difco) 3 g/ml、クロラ
ムフェニコール10 μg/ml、pH 7.0、寒天
1.8%)にレプリカし、クロラムフェニコール耐
性でかつトリプトファン要求性の消失した株を
AS60を用いた区分から2株、№38を用いた区分
から1株、№30を用いた区分から1株得た。

上記5株からプラスミドを抽出したところ、い
ずれのプラスミドもベクタープラスミドpAJ1844
よりも明らかに大きく、AS60を用いた区分から得

た組換えプラスミドをptrpE36、ptrpE4、№38を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpD3851、№30を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpB301と名付けた。

1-5 再形質転換

1-4 で得た組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301上に各々アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子が存在することを確認するため、ptrpE36、ptrpE4をAS60に、ptrpD3851を№38に、ptrpB301を№30に再度形質転換した。

生じたクロラムフェニルコール耐性コロニーのうちそれぞれ10個を釣り上げ、トリプトファン要求性を調べた。その結果、いずれもが要求性を消失しており、ptrpE36、ptrpE4にはアンスラニル酸シンターゼ遺伝子が、ptrpD3851には、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子が、ptrpB301にはトリプトファンシンター

ゼβサブユニット遺伝子が存在することが明らかになった。ただしptrpE4の形質転換株では栄養要求性の消失の程度、及び最少培地上でのアンスラニル酸の蓄積がptrpE36の形質転換株に比較して悪く、ptrpE4にはアンスラニル酸シンターゼの遺伝子の一部が欠けているのではないかと示唆された。

1-6 組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の作製

実施例1-2で用いた方法により組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301を調製し、常法に従い各種制限酵素で切断し挿入DNA断片の制限酵素地図を作製した(第1図)。

実施例2

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロン全域のクローニング
ブレビバクテリウムラクトフェルメンタム
AJ11225から自然突然変異により分離した5-フルオロトリプトファン抵抗性の№1041(トリプトファンによるアンスラニル酸シンターゼのフィー

ドバック阻害が解除した株)から実施例1で示した方法により染色体DNAを調製し、制限酵素BamHI 或いはSalI、又はXhoIで完全に切断し、E.coliのベクターpUC18(Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119(1985))の各制限酵素切断部位に連結し、E.coli JM109(Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119(1985))を形質転換し、X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactoside)、IPTG(isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside)、アンピシリンを含む寒天培地にプレーティングした。37℃で24時間培養後出現した白色コロニー合計約1500コロニーをニトロセルロースフィルター上に釣り上げた。実施例1で得たアンスラニル酸シンターゼ遺伝子(trpE)を有するptrpE36の1.2kbのPstI挿入断片をプローブにして、コロニーハイブリダイゼーション(Grunstein, M., Wallis, J.: Methods in Enzymology, 68, 379, Academic Press Inc., New York(1979))を行ない制限酵素BamHIを用いた区分から1つ、制限酵素SalIを使用した区分から1つのポジティブクロー

ンを得た。BamHI区分から得た組換えプラスミドをptrpE97、SalI区分から得たプラスミドをptrpE42と名付け、実施例1で示した方法に挿入DNA断片の制限酵素切断地図を作成した(第1図)。

その結果、ptrpE97はptrpE36、^{ptrpD3851}~~ptrpD3851~~、ptrpB301の挿入PstI断片と同じ制限酵素地図を有するPstI断片を有しており、ptrpE42はptrpE36^{ptrpD3851}~~ptrpD3851~~のPstI断片及び~~ptrpD3851~~のPstI断片の一部と同じ制限酵素地図を有していることが明らかとなった。又、ptrpE97とptrpE42は共通のBamHI-SalI断片を有していた。

実施例3

N-(5-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子(trpC)のサブクローニング及びトリプトファンシンターゼのサブユニット遺伝子(trpA)のサブクローニング

第1図の組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の比較からtrpD遺伝子とtrpB遺伝子の間にtrpC遺伝子が、trpB遺伝子の下流にtrpA遺伝

子が存在するのではないかと考えられていた。そこで各遺伝子の存在を確認するため以下の実験を行った。

3-1 trpC遺伝子のサブクローニング

組換えプラスミドptrpE97 から第1図に示した約2 kb. のSstI-EcoRI断片を分画し、SstI, EcoRIで切断したpUC19(Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119, 1985) に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置した。或いは第1図の約2.6 kb. のSstI-Hind III断片を分画しSstI, Hind IIIで切断したpUC18(Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119, 1985))に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置し、E. coli CGSC No 5889 (trpC60, pyrF287, hisG1, lac253, rpsL8, λ^-) を形質転換した。その結果、SstI-EcoRI断片、或いはSstI-Hind III断片を有する組換えプラスミドは、E. coliの要求性を消失させた。

3-2 trpA遺伝子の存在の確認

組換えプラスミドptrpE97 から第1図に示した

列はブレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの発現に必要なRNA ポリメラーゼの結合部位(trpプロモーター)、リボゾームの結合部位、アンスラニル酸シンターゼ遺伝子(trpE, trpG)、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子(trpD)、N-(5-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子(trpC)、トリプトファンシンターゼ遺伝子

(trpB, trpA) に対応するDNA 配列、及び停止配列(ターミネーター)を含むことが判明した。

又、プロモーターとtrpE構造遺伝子との間は、転写レベルでの発現調節機構であるリプレッションに関与するオペレーター領域及び翻訳レベルでの発現調節機構アテニュエーションに関与するリーダーペプチド(trpL)をコードする領域とアテニュエーター様構造が存在する領域が存在すると推定された(第3図)。ターミネーターの構造は第6図に示した。

約2.4 kb. のNruI-BamHI断片を分画し、SmaI, BamHIで切断したpUC18に連結し、lacプロモーターからの転写が可能になるように配置し、E. coli CGSC No 5644 (trpA33, rha-7, λ^-) を形質転換した。その結果、NruI-BamHI断片を有する組換えプラスミドを保持する形質転換株では、トリプトファン要求性の消失が認められた。

実施例4.

トリプトファンオペロンの塩基配列の決定

実施例1で得られたptrpE36、ptrpD3851、ptrpB301及び実施例2で得られたptrpE97を有する形質転換株から各々プラスミドの調製を行った。各々のプラスミドの挿入DNA断片についてpUC18或いはpUC19又はM13mpl0(Messing, J. and Vieira, J., Gene 19, 269(1982))を用いるdideoxy chain termination法(Sanger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463(1977))により第2図に示した塩基配列決定のための戦略図によって、トリプトファンオペロン全塩基配列を決定した。その結果、次に示すDNA塩基配列が得られ、この塩基配

実施例5.

プロモーターの単離と活性確認

塩基配列の決定の結果、推定されたトリプトファンオペロンのプロモーターを単離し、その機能を確認するため、第4図に示したように、ptrpE97、或いはptrpE36のEcoRI-Hind III断片(約550 bp.)をE. coliのプロモータープロベクターpkk175-6(アンピシリン耐性(Ap)、テトラサイクリン(Tc)感受性)(Brosius, J., Gene 27, 151(1984))にサブクローンした。得られた組換えプラスミドptrpP01はE. coli中でTc耐性を発現した。

さらに、pAM330由来のトリメトブリム耐性のベクター、pAJ226のPstI切断部位にPstIで切断した上記組換えプラスミドptrpP01を連結し、ブレビバクテリウムAJ11225を形質転換したところTc耐性の発現が認められた。この組換えプラスミドptrpP02を有する形質転換株のTc耐性度は第1表に示したように、Trp.存在下ではTcに対する感受性が増した。従ってこの領域には、プロモーターとオペレーターが存在すると考えられる。

第1表 カザミノ酸を添加した最少増地におけるテトラサイクリン耐性及びクロラムフェニコール耐性

	テトラサイクリン耐性度 (μg/ml)		クロラムフェニコール耐性度 (μg/ml)	
	トリプトファン無添加	トリプトファン添加 (1 mg/ml)	トリプトファン無添加	トリプトファン添加 (1 mg/ml)
ptrpP01 in <i>E. coli</i>	20	20	600<	600<
ptrpP02 in <i>Brevibacterium lactofermentum</i>	25	5	600<	600<
ptrpP03 in <i>E. coli</i>	20	20	400	200
ptrpP04 in <i>E. coli</i>	20	20		
ptrpP05 in <i>E. coli</i>				
ptrpP06 in <i>E. coli</i>				
pEB003TR* in <i>E. coli</i>				

*pEB003TRは*E. coli*のトリプトファンプロモーターを有している

スミドpAJ234を用いて、L-トリプトファン生産について検討した。

pAJ234を用い、m-フルオロフェニルアラニン及び5-フルオロトリプトファン耐性株ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタムM247¹⁻⁴を種で述べた方法により形質転換し、クロラムフェニコール耐性を指標として形質転換株を選択した。かくして得られたAJ12195 (FERM-P8014) を培養し、トリプトファン生産能を調べたところ第2表に示す結果を得た。

培養はトリプトファン生産培地 (グルコース 130 g、(NH₄)₂SO₄ 25 g、フマル酸 12 g、酢酸 3 g、KH₂PO₄ 1 g、MnSO₄・7H₂O 10 g、MgSO₄・7H₂O 1 g、d-ビオチン 50 μg、サイアミン塩酸塩 2000 μg、メチオニン 400 mg、チロシン 650 mg、大豆蛋白加水分解液「味液」50 ml、CaCO₃ 50 gを水 1 lに含む、pH 6.5) 20 mlを500 mlの坂口フラスコに入れたものに被検菌株を植えつけ、30℃にて72時間、振盪下に行なった。培養後、遠心上清中のL-トリ

次にプロモーター領域をさらに限定するため、EcoRI-HindIII断片をAluI或いは、HaeIIIで切断し、各断片をpKK¹⁷⁵⁻⁶上にサブクローン化した (第5図)。その結果AluI-HindIII断片 (51bp) 及び HaeIII-HindIII (135bp) 上にプロモーターが存在することが明らかとなった。同様の結果を*E. coli*のプロモータープロベクターpKK232-8 (Ap耐性、クロラムフェニコール感受性) を用いて得ており、AluI-HindIII断片 (51bp) 上にプロモーターが存在することを確認した。

実施例6.

ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子 (trpD)、N-(5-ホスホリボシル) アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子 (trpC)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (trpB, trpA) の増幅によるトリプトファン生産菌の育種。

クローニングしたブレバクテリウムラクトフェルメンタムトリプトファンオペロンのうちtrpD, trpC, trpB, trpAの4遺伝子を有する組換えプラ

ミドをロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) ATCC 8042を定量菌株として用いるバイオアッセイ法によって求めた。

第2表 形質転換株のL-トリプトファン蓄積量

菌 株	L-トリプトファン蓄積量
M 247	0.16 g/dl
FERM P-8014 AJ 12195 (M 247/pAJ 234)	0.52 g/dl

尚、M 247 を得るためには寄託されたAJ 12195より宿主細胞を損うことなく宿主細胞中の複合プラスミドを除去することが可能である。即ち、プラスミドは宿主より自然に失われることもあるし、「除去」操作によって除くこともできる (Bact. Rev., 36, p361-405 (1972))。他の除去操作の例は以下の通りである。AJ 12195をCMG 液体培地に接種し、37℃で一晩培養 (高温処理) 後、培養液を適当に希釈し、クロラムフェニコールを含有し又は含有しないCMG 寒天培地に塗布し、30℃で1~3日間培養する。かくしてクラロム

フェニコール感受性株として分離される株が
N 247 である。

4. 図面の簡単な説明

第 1 圖

組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素
地図

第 2 圖

プレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの塩基配列決定のため
の戦略図

種々の制限酵素で切断したDNA断片をpUC18、pUC19 或いはM13mp10 にクローン化し、矢印で示した方向へ、dideoxy 法により塩基配列を決定した

第 3 圖

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの制御領域
—ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
lrpE構造遺伝子の 5' 上流域の塩基配列並びに
推定されるアミノ酸配列、及び、予想される

RNA の 2 次構造 -

第 4 圖

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの構造とプロモーター、
オペレーター領域の単離、同定のための戦略

第 5 図

プレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの構造とプロモーター、
オペレーター領域の限定のための戦略

-35 及び-10 は*E.coli*のプロモーターコンセンサス配列の-35、及び-10 領域に相当する領域を示す

第 6 圖

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンのターミネーターの構
造

特許出願人 味の素株式会社

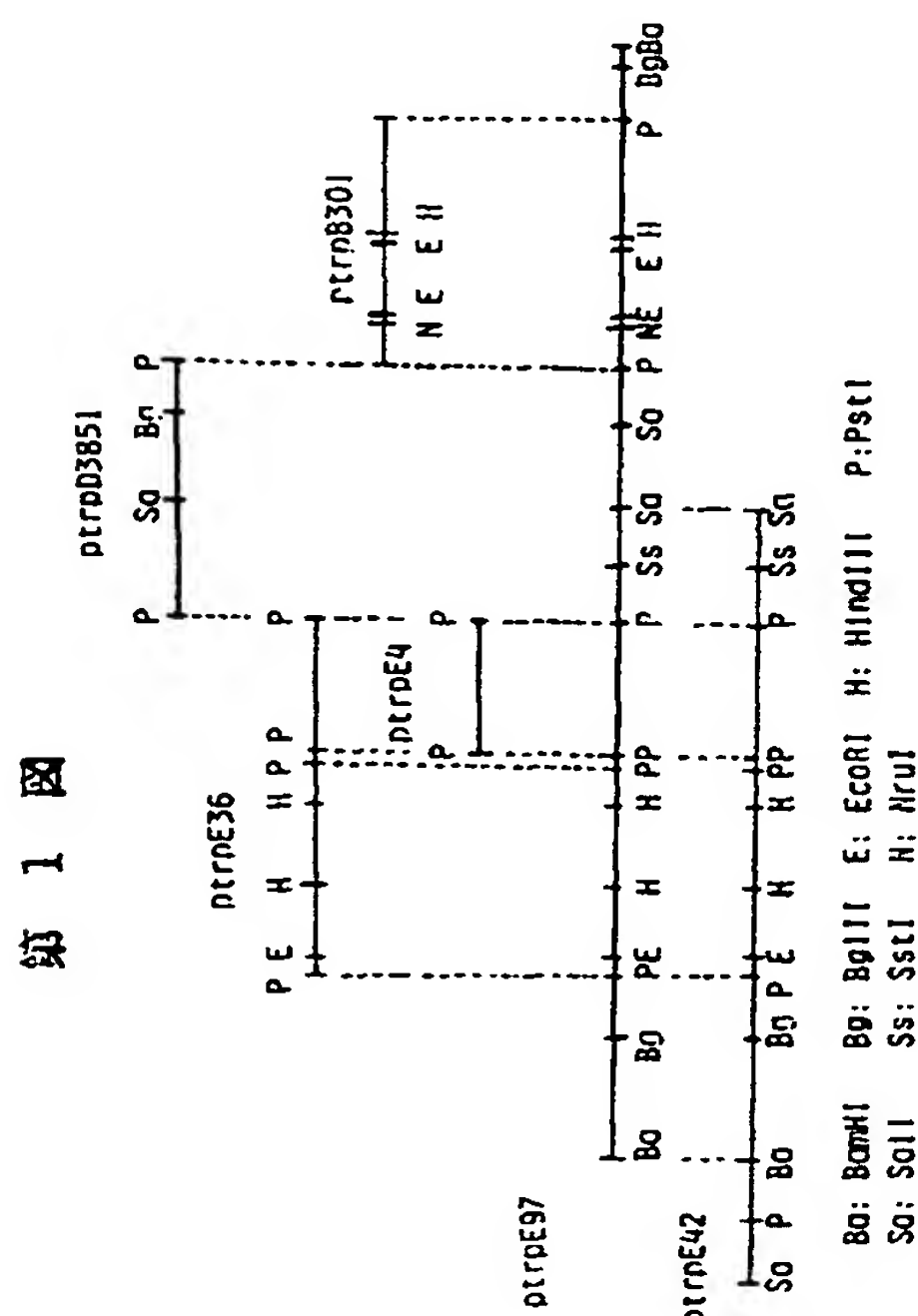
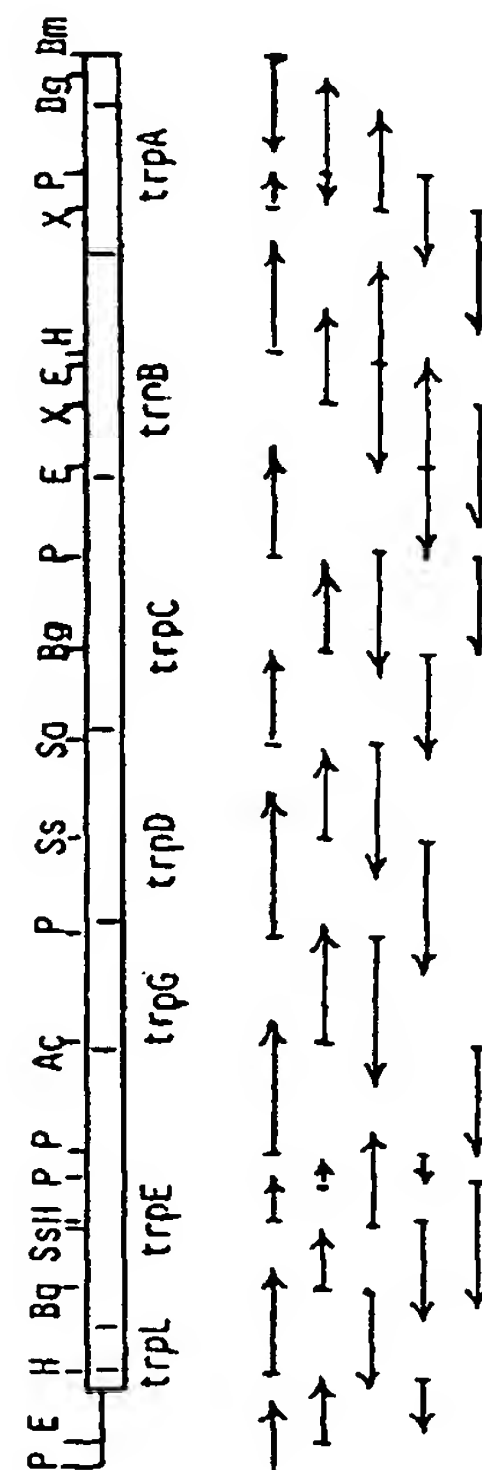


圖 2 示



五

HaeIII

```
AGGAGGCTGG 1GGTGTGACT ATTACCTCGG CGATTATCAA CAAGACCTCGG CTGAATGCCC CCAAGATTGA
TCTCTGGGCC ACCACACTGA TAATGGAGCC GCTAATAGTT GTTCTGAGGC GACTTACGGG GGTCTTAAT
```

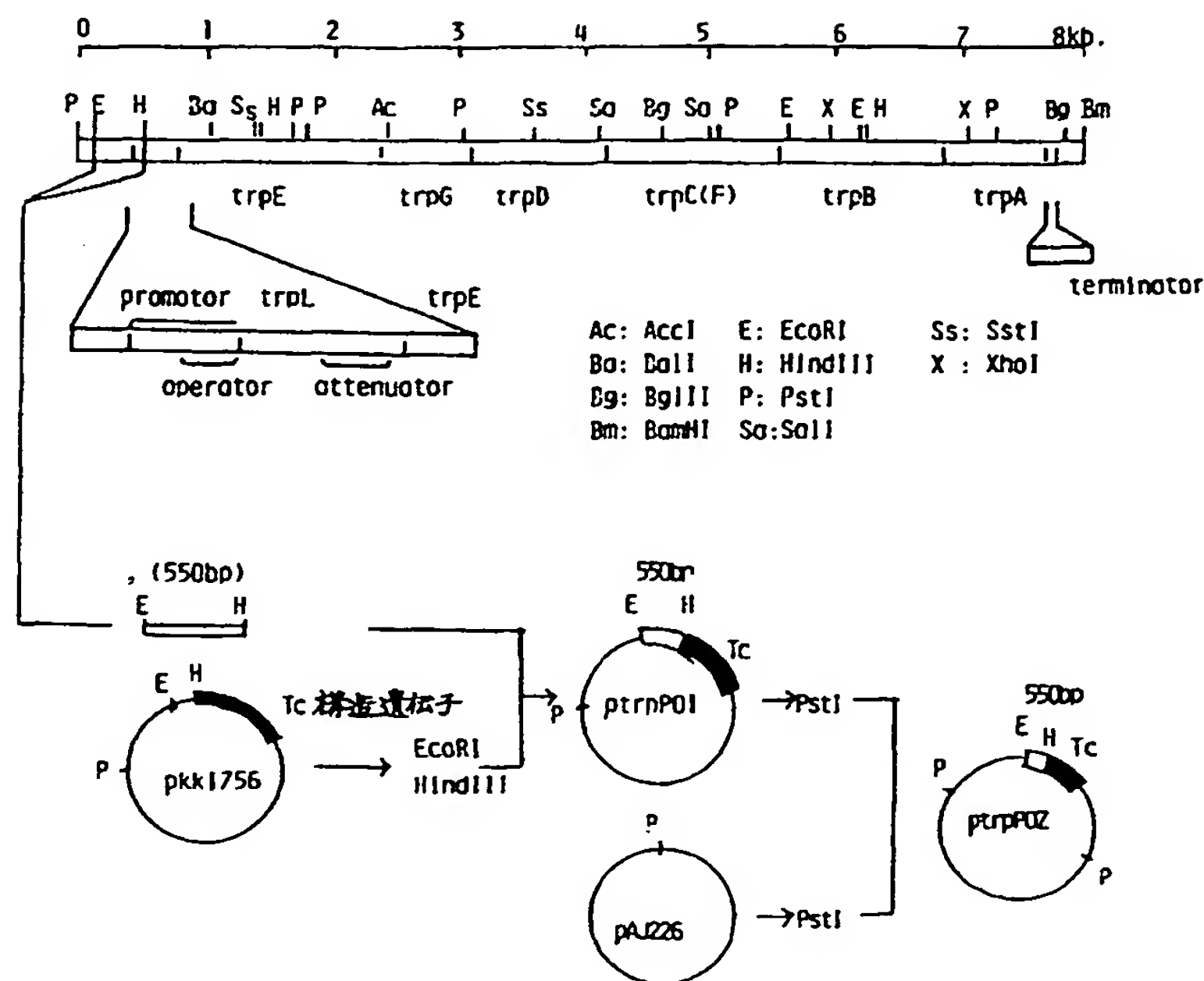
A1uI

```
CTTGGATGCA GTGCTAGTC TCGCGGAAC TACATAGAA CCCAAAATG ATTATAAAT GAGACAAGCT T
GAACCTAGCT CACGATCTC GAGGCCCTTG ATGAGTCTT GGGTTTATC TAAATATTA CTCTGTCGA A
```

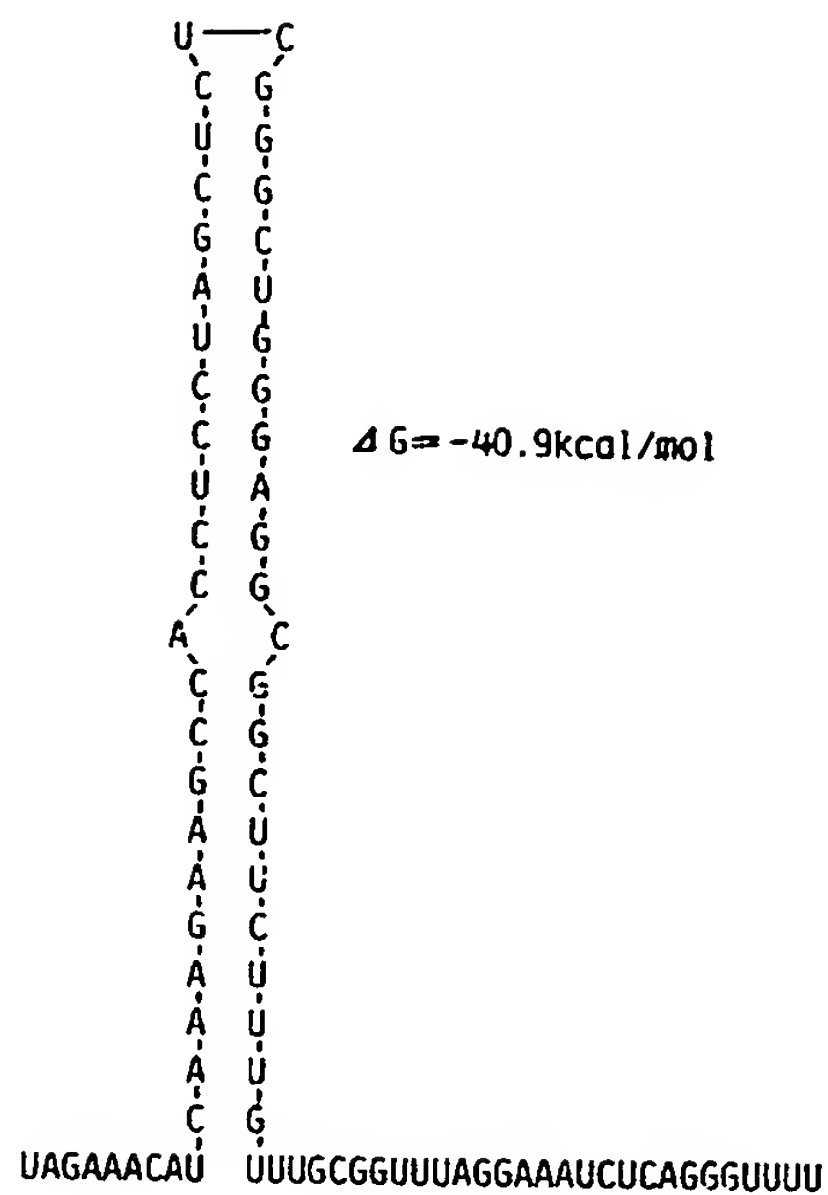
-10

HindIII

第 4 図



第 6 図



第 1 頁の続き

⑤ Int. Cl. 1

// C 12 P 21/02
 (C 12 P 13/22
 C 12 R 1:13)
 (C 12 P 13/22
 C 12 R 1:15)

識別記号

庁内整理番号

6712-4B

手続補正出

昭和61年6月3日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和61年特許願第87600号

2. 発明の名称

トリプトファンオペロン、トリプトファンオペロンにコードされるペプチド及び蛋白、トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用方法及びトリプトファンの製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都中央区京橋一丁目5番8号

名称 (006) 味の素株式会社

代表者 取締役社長 歌山 勝彦

4. 補正命令の日付

自発

5. 補正により増加する発明の数

なし

6. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

および図面(第1図、第2図、第4図)

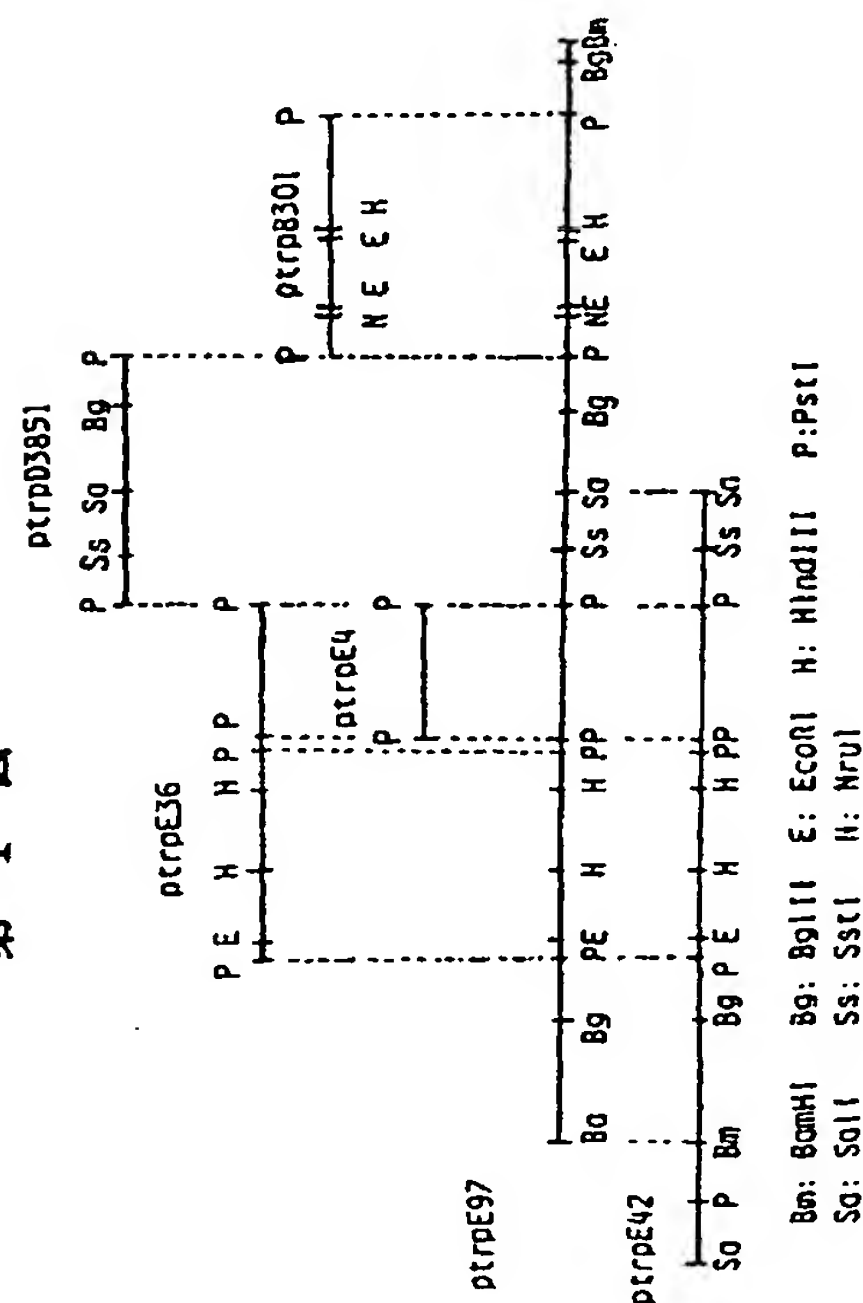
7. 補正の内容

(1) 明細書第11頁11~14行目「なお、第2式は・・・配列を示す。」を「尚、第2式はtrpE、第3式はtrpG、第4式はtrpD、第5式はtrpC、第6式はtrpB、第7式はtrpA各構造遺伝子の塩基配列から推定される各アミノ酸配列を示す。」と訂正する。

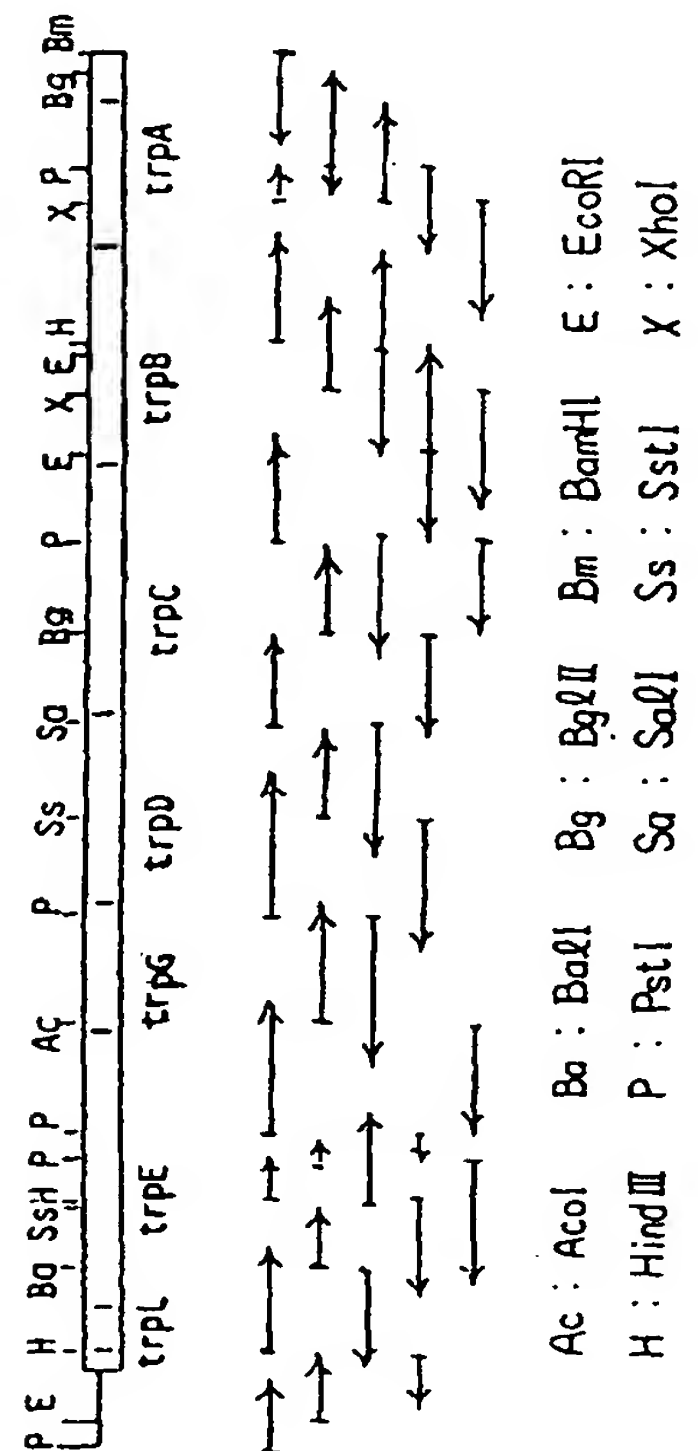
(2) 第1図、第2図、第4図を別紙の通り訂正する。

以上

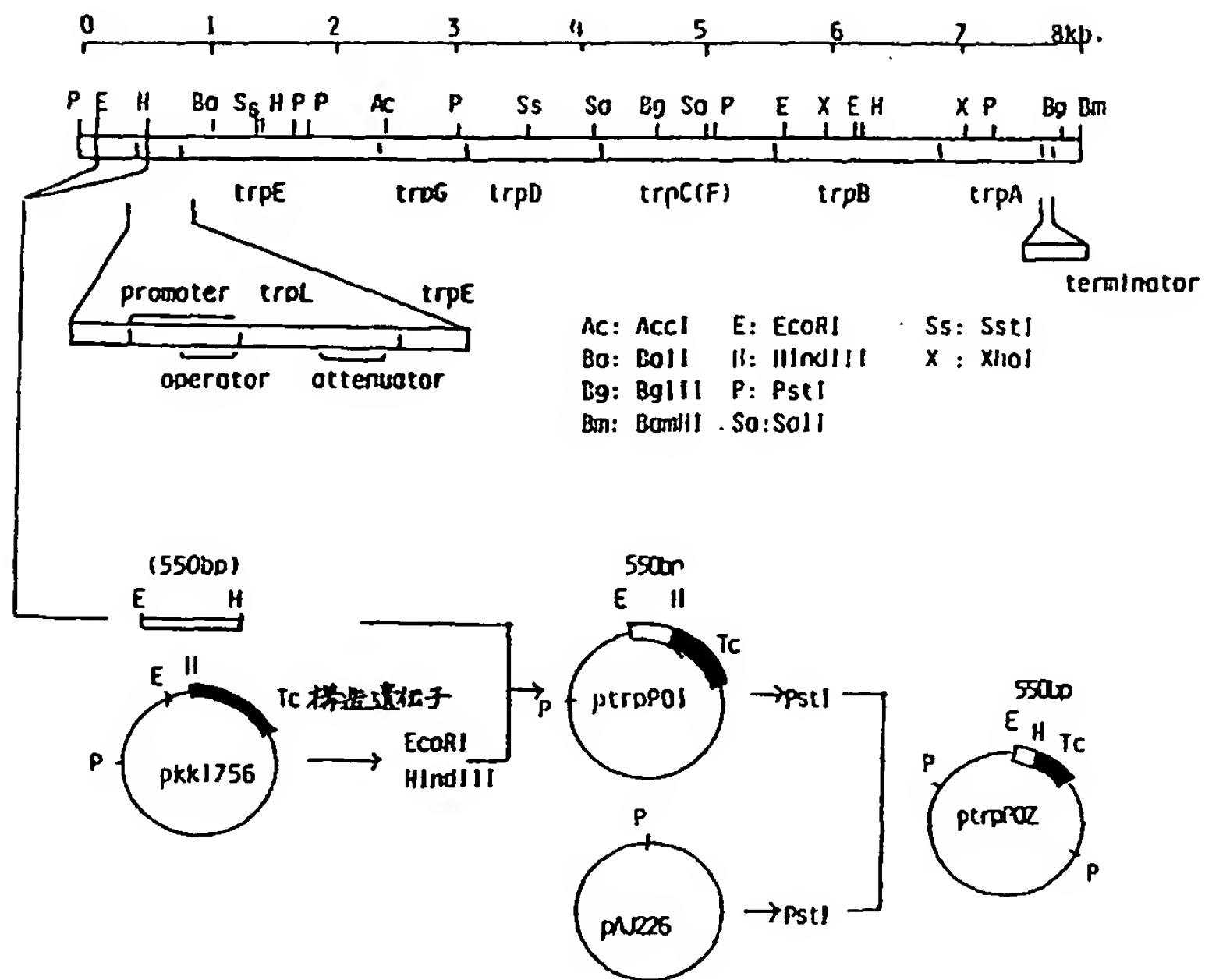
第1図



第2図



第 4 図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.